

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_密级\_\_\_\_

学号: 30520080150435

UDC \_\_\_\_

廈門大學

博 士 学 位 论 文

靶向 tRXR $\alpha$ /PI3K/AKT 信号通路的抗  
肿瘤药物研究

Antitumor Drugs That Target tRXR $\alpha$ /PI3K/AKT  
Signal Pathway

蒋福全

指导教师姓名: 张晓坤 教授

曾锦章 教授

专 业 名 称: 化学生物学

论文提交日期: 年 月

论文答辩时间: 年 月

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评阅人: \_\_\_\_\_

2011 年 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

## 英文缩略词

英文缩写	英文全名	中文名称
AF	Activation function	转录激活功能域
AR	androgen receptor	雄激素受体
ATRA	All-trans-retinoic acid	全反式视黄酸
CREB	cAMP-response element-binding protein	cAMP 应答元件结合蛋白
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride	4,6 二氨基 2 苯基吲哚
DBD	DNA-binding domain	DNA 结合结构域
DD	Death domain	死亡结构域
ER	Estrogen receptor	雌激素受体
GR	glucocorticoid receptor	糖皮质激素受体
I $\kappa$ B	inhibitory protein of NF- $\kappa$ B	核因子抑制蛋白
IKK	I $\kappa$ B kinase	核因子抑制蛋白激酶
LBD	ligand-binding domain	配体结合区
MR	mineralocorticoid receptor	盐皮质激素受体
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-6-yl] -6,5-diphenyltetrazolium bromide	噻唑蓝
NES	nuclear export signal	出核信号
NF- $\kappa$ B	nuclear factor-kappa B	核因子 $\kappa$ B
NLS	nuclear localization sequence	核定位序列
NR	nuclear receptor	核受体
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
PI	phosphatidylinositol	磷脂酰肌醇
PIP	phosphatidylinositol 4 phosphate	磷脂酰肌醇-4-磷酸
PIP2	phosphatidylinositol 4, 5 biphosphate	磷脂酰肌醇-4, 5-二磷酸

PR	progesterone receptor	孕激素受体
RAR	retinoic acid receptor	视黄酸受体
RHD	Rel homology domain	Rel 同源结构域
RIP	receptor interacting protein	受体连接蛋白
RXR	retinoid X receptor	视黄素 X 受体
siRNA	Small interference RNA	干扰小 RNA
TNF	Tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
TNFR	tumor necrosis factor receptor	肿瘤坏死因子受体
TRAF	TNFR-associated factor	TNFR 连接因子
TR	thyroid hormone receptor	甲状腺激素受体
tRXR	Truncated RXR	RXR 片段

厦门大学博硕士论文摘要库

## 摘要

类视黄醇 X 受体 (retinoid X receptor, RXR), 是核受体超家族中重要的一类, 参与了人体代谢、生长、发育、分化、死亡和免疫等几乎所有的生理调控。其表达或功能异常与人体的许多疾病有关。最近有研究发现肿瘤细胞与癌组织中存在截断型 RXR $\alpha$  (tRXR $\alpha$ ), 但功能尚不明确。

通过动物实验我们发现 tRXR $\alpha$  可以促进裸鼠移植瘤的生长, 阐述了 tRXR $\alpha$  癌蛋白的促肿瘤生长作用。经筛选, 我们获得了一个与 tRXR $\alpha$  结合, 且拮抗其转录激活及促肿瘤生长活性的夹氧杂蒽类化合物 CF-31。此化合物结构非常独特, 虽然没有经典配体结合 tRXR $\alpha$  所必须的极性端, 但却与 tRXR $\alpha$  有很强的亲和力。计算机模拟显示, CF-31 骨架结构和经典 RXR $\alpha$  配体相似, 但有一伸长的 3-甲基-2-丁烯支链, 该侧链能够与 tRXR $\alpha$ -LBP 区的 Val349, Ile324, Phe313, Phe346 和 Ile268 形成很强的疏水相互作用, 阐明了一个新型的 RXR $\alpha$  配体结合位点。

CF-31 能够抑制多种肿瘤细胞中 AKT 的激活, 诱导细胞凋亡。干扰 RXR $\alpha$  会削弱 CF-31 抑制 TNF $\alpha$  诱导 AKT 激活的能力, 而转入 tRXR $\alpha$  会增强这种能力。CF-31 还可以增强其他抗癌药物诱导的细胞凋亡, 且这种协同作用是 tRXR $\alpha$  依赖性的。最重要的是 CF-31 可以抑制 TNF $\alpha$  所诱导的 tRXR $\alpha$  与 p85 相互作用, 从而抑制 TNF $\alpha$  通过激活 AKT 介导的生存通路, 增强其激活的外源性凋亡通路。

综上所述 tRXR $\alpha$  可以促进肿瘤的生长, CF-31 通过直接与 RXR $\alpha$  结合负性调控 tRXR $\alpha$ /PI3K/AKT 生存通路。本研究为我们以 tRXR $\alpha$ /PI3K/AKT 通路为靶点, 开发更为安全、有效、可控的抗肿瘤药物提供理论基础与实验依据。

**关键词:** Truncated Retinoid X receptor; CF31; AKT

## ABSTRACT

Retinoid X receptor (RXR)  $\alpha$ , a unique member of the nuclear receptor superfamily, plays a critical role in many biological processes. Altered expression and function of RXR $\alpha$  is implicated in the development of a number of diseases such as cancer. Consistently, proteolytic cleavage of RXR $\alpha$  (tRXR $\alpha$ ) protein are often found in cancer cells and tumor tissues. However, the function and the underlying action mechanism of tRXR $\alpha$  remain to be identified.

We showed that expression of tRXR $\alpha$  could promote the growth of tumor cells in animal, revealing its oncogenic potential. In an effort to identify agents that inhibit tRXR $\alpha$ -mediated tumor cell survival function, we reported here our identification of CF31, an active compound of *Cratoxylum formosum* ssp. *Pruniflorum*, which targeted tRXR $\alpha$ -mediated survival pathway for inhibiting AKT activation and inducing apoptosis of cancer cells. CF31 bound to RXR $\alpha$  and acted as an RXR $\alpha$  transcriptional antagonist. Modeling studies showed that unlike other known RXR $\alpha$  ligands the 3-Methylbut-2-enyl group of CF31 occupied a hydrophobic space formed by Val349, Ile324, Phe313, Phe346, and Ile268 in the RXR $\alpha$  ligand-binding pocket. These results identified a potential new ligand-binding site in RXR $\alpha$ . CF31 potently inhibited AKT activation in various cancer cells and sensitized the apoptotic response of cancer cells to chemotherapeutic agents in an RXR $\alpha$ -dependent manner. While the apoptotic effect of CF31 in tRXR $\alpha$ -expressing cells was greatly impaired by siRNA-mediated tRXR $\alpha$  inhibition, transfection of tRXR $\alpha$  expression vector in cancer cells enhanced their apoptotic response to CF31. Importantly, the combination of CF31 with TNF $\alpha$  suppressed TNF $\alpha$ -induced tRXR $\alpha$  interaction with p85 $\alpha$ , a regulatory subunit of PI3K, and subsequently activation of AKT, leading to apoptosis of cancer cells through TNF $\alpha$ -dependent extrinsic apoptotic pathway, revealing the ability of CF31 to shift TNF $\alpha$  signaling from survival to death. Together, our results demonstrate that CF31 is a potent inhibitor of tRXR $\alpha$ -dependent AKT survival pathway, identifying a new lead to develop selective agents targeting tRXR $\alpha$  for cancer therapy.

**Keyword:** Truncated retinoid X receptor; CF31; AKT



摘 要.....	I
ABSTRACT.....	II
前 言.....	1
1.核受体概述.....	1
2. 类视黄醇X受体.....	2
3. PI3K/ AKT 信号通路.....	7
4.TNF $\alpha$ 及其诱导的生存与死亡信号通路.....	10
5. 研究的目的、内容和意义.....	15
材料和方法.....	17
1. 实验材料.....	17
2. 实验方法.....	24
实验结果.....	38
(一) Sulindac及其衍生物K-80003 抑制裸鼠移植瘤的生长.....	38
1.tRXR $\alpha$ 促进裸鼠移植瘤的生长.....	38
2.K-80003 抑制人裸鼠移植瘤细胞生长.....	41
(二) CF-31 靶向tRXR $\alpha$ /PI3K/AKT信号通路抑制AKT的激活.....	44
1. CF-31 与RXR $\alpha$ 直接结合.....	44
2. CF-31 抑制RXR $\alpha$ 依赖的AKT激活.....	48
3.CF-31 诱导RXR $\alpha$ 依赖的凋亡.....	51
4.CF-31 抑制tRXR $\alpha$ 与P85 的相互作用.....	55
5. CF-31 激活TNF $\alpha$ 诱导的外源性凋亡通路.....	55
6. CF-31 抑制HeLa细胞的克隆形成.....	56
7. CF-31 能够增强喜树碱的凋亡作用.....	56
讨 论.....	59
1. K-80003 抑制裸鼠移植瘤的生长.....	61
2.CF-31 与RXR $\alpha$ 直接结合.....	61
3. RXR $\alpha$ 依赖的CF-31 抑制TNF $\alpha$ 激活AKT.....	62
结论与展望.....	64

参考文献.....	65
致 谢.....	78

厦门大学博硕士论文摘要库

## Contents

ABSTRACT (Chinese) .....	I
ABSTRACT .....	II
Introduction .....	1
1. Nuclear receptors .....	1
2. Retinoid X receptor .....	2
3. PI3K/ AKT signal pathway .....	7
4. Signaling pathways initiated by $\text{TNF}\alpha$ .....	10
5. Aim and significance .....	15
Materials and Methods .....	17
1. Materials .....	17
2. Experimental methods .....	24
Results .....	38
I. Sulindac and K-80003 inhints the growth of colon cancer xenografts in nude mice .....	38
1. tRXR $\alpha$ can promotes the growth of colon cancer xenografts in nude mice ....	38
2. Sulindac and K-80003 inhints the growth of colon cancer xenografts in nude mice .....	41
II. CF-31 inhibts AKT activation and induces apoptosis of cancer cells through targeted tRXR $\alpha$ -mediated survival pathway .....	44
1. CF-31 binding to RXR $\alpha$ .....	44
2. CF-31 inhibits RXR $\alpha$ -dependent AKT activation by $\text{TNF}\alpha$ .....	48
3. CF-31 induces RXR $\alpha$ -dependent apoptosis .....	51
4. CF-31 inhibits tRXR $\alpha$ -p85 $\alpha$ interaction .....	55
5. CF-31 activates $\text{TNF}\alpha$ -induced extrinsic apoptotic pathway .....	55
6. CF-31 inhibits clonogenic survival of HeLa cells .....	56
7. CF-31 enhances apoptotic effect of Camptothecine .....	56
Discussion .....	59
1. K-80003 inhints the growth of colon cancer xenografts in nude mice .....	60

2. CF-31 binds to RXR $\alpha$ .....	60
3. CF-31 inhibits RXR $\alpha$ -dependent AKT activation by TNF $\alpha$ .....	62
Conclusion and Prospect .....	64
References .....	65
Acknowledgement.....	78

## 前言

### 1.核受体概述

核受体（nuclear receptor, NR）是一类在生物体内广泛分布的、表达于胞浆或细胞核内的蛋白质，广泛存在于脊椎动物、节肢动物和线虫类动物中，是多细胞生物体内含量最丰富的几大类转录因子超家族成员之一<sup>[1-5]</sup>。它们以单体、同源二聚体或异源二聚体的方式与DNA响应元件结合，激活或抑制特定靶基因的转录。在体内，核受体可被类固醇、维生素A和甲状腺激素等脂溶性小分子调节，调控细胞生长、增殖、分化、代谢、免疫反应和凋亡等几乎所有的生物学过程。核受体本身或受其调控的基因表达的紊乱是糖尿病、肥胖病、生殖系统疾病、炎症、心血管疾病、肿瘤等病理过程的重要因素<sup>[6-9]</sup>。



图 1. 核受体结构模式图

DBD: DNA 结合结构域; LBD: 配体结合结构域

Fig.1. Structure of nuclear receptors

核受体家族的成员具有非常保守的结构特征（图1）<sup>[10-12]</sup>。除少数结构特殊的核受体外，核受体的N端具有配体非依赖的激活功能域AF1（activation function 1, AF1，即A / B区），其作用与启动子的特殊序列有关<sup>[13]</sup>；其后是DNA结合结构域（DNA binding domain, DBD, C区），该区具有很高的保守性，由两个高度保守的锌指（zinc finger）结构组成，负责核受体与DNA上的结合元件结合；C区之后是铰链区D区（hinger region, D区），该区具有一定的柔性，在核受体中

保守性最低<sup>[14]</sup>；E区是配体结合结构域（ligand binding domain, LBD, E区），该区域具有较高的保守性，通常由12个 $\alpha$ 螺旋和两个 $\beta$ 折叠组成，其中第12个 $\alpha$ 螺旋序列高度保守，是转录激活域AF2的核心区，LBD区的 $\alpha$ 螺旋与 $\beta$ -折叠排列成一个螺旋三明治的结构<sup>[15]</sup>。配体结合口袋（ligand binding pocket, LBP）就位于这个结构中心的内部，是一个隐藏的，疏水的口袋。在配体的作用下，受体的构型发生变化，诱导形成同源或异源二聚体，通过调控基因转录或细胞内转位，影响细胞的各种生理过程<sup>[16-18]</sup>；在部分核受体中存在F区，它可能参与了配体的精确识别及辅抑制子的招募。

核受体成员众多，构成了一个大家族，根据配体的不同，又可分为三大类：第一类是类固醇受体家族，包括雄激素受体（androgen receptor, AR）、雌激素受体（estrogen receptor, ER）、孕激素受体（progesterone receptor, PR）、糖皮质激素受体（glucocorticoid receptor, GR）和盐皮质激素受体（mineralocorticoid receptor, MR）等；第二类是非类固醇受体家族，包括视黄酸X受体（retinoid X receptor, RXR）、视黄酸受体（retinoic acid receptor, RAR）、甲状腺激素受体（thyroid hormone receptor, TR）、维生素D3受体（vitamin D receptor, VDR）和过氧化物酶激活受体（peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR）等；第三类是孤儿受体（orphan nuclear hormone receptors），到目前为止未发现其特异性生理配体<sup>[19,20]</sup>，如TR3等。

## 2. 类视黄醇 X 受体

类视黄醇 X 受体（retinoid X receptor, RXR），是核受体超家族中重要的一类，属非类固醇受体。RXR 是配体激活的转录调节因子，参与了人体代谢、生长、发育、分化、死亡和免疫等几乎所有的生理调控，其表达或功能异常与人体许多疾病有关，比如肿瘤、代谢综合症、银屑病等<sup>[21-25]</sup>。1990 年 Mangelsdorf 等用人 RAR $\alpha$  的 DNA 结合区域的 cDNA 筛选 cDNA 文库，发现一种新的编码 462 个氨基酸的序列，其编码产物能被视黄酸激活，并诱导转录。经研究发现，其结构与 RAR 有很大的差异，对视黄酸的反应也比 RAR 低，故被命名为人视黄酸 X 受体。根据氨基酸序列的不同、对天然和合成配体反应差异及调节下游靶基因的表达能力，又把 RXR 分为  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ （RXR $\alpha$ 、RXR $\beta$ 、RXR $\gamma$ ）三种

亚型,其中以 RXR $\alpha$  最为重要,广泛分布在生物体的多种组织中,行使重要功能。

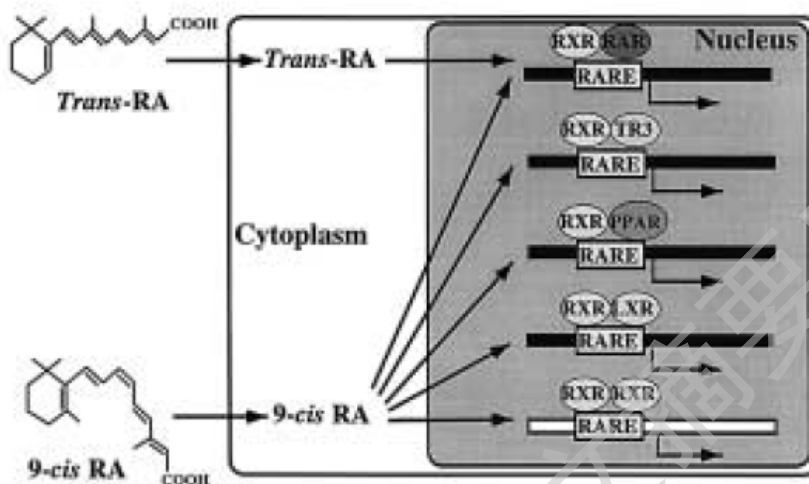


图 2. 视黄醇受核内作用机制 (引自文献 26)

Fig.2. Mechanism of action of retinoid receptors

## 2.1 RXR 的基因型功能

在众多的核受体超家族成员中, RXR 是非常重要和独特的, 被称为 “Master Regulator”, 很多核受体要与其形成二聚体来发挥生理功能。RXR 以同源二聚体或异源二聚体的方式调控靶基因转录<sup>[26,27]</sup> (见图 2)。RXR 可以与过氧化物酶激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)、视黄酸受体 (retinoic acid receptor, RAR)、甲状腺激素受体 (thyroid hormone receptor, TR)、维他命 D3 受体 (vitamin D receptor, VDR)、肝 X 受体 (liver X receptor, LXR)、法尼醇 X 受体 (farnesoyl X receptor, FXR)、孕烷 X 受体 (pregnane X receptor, PXR), 鸡卵清蛋白上游启动子转录因子 II (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II, COUP-TFII) 和 Nur77 (nerve growth factor-induced gene B, NGFI-B) 等形成异源二聚体<sup>[28-33]</sup>。对于 RXR/PPAR, RXR/Nur77, RXR/LXR, RXR/PXR, RXR/FXR 等异源二聚体, 单一的 RXR 的配体即可激活异源二聚复合物, 这类异源二聚体称为 “许可异源二聚体” (permissive

heterodimers)。对于 RXR/RAR, RXR/VDR 和 RXR/TR, RXR 的激动剂必须和二聚体中的相应配体同时作用才能激活异源二聚体, 这些异源二聚体称为“非许可异源二聚体”(non-permissive heterodimers)。

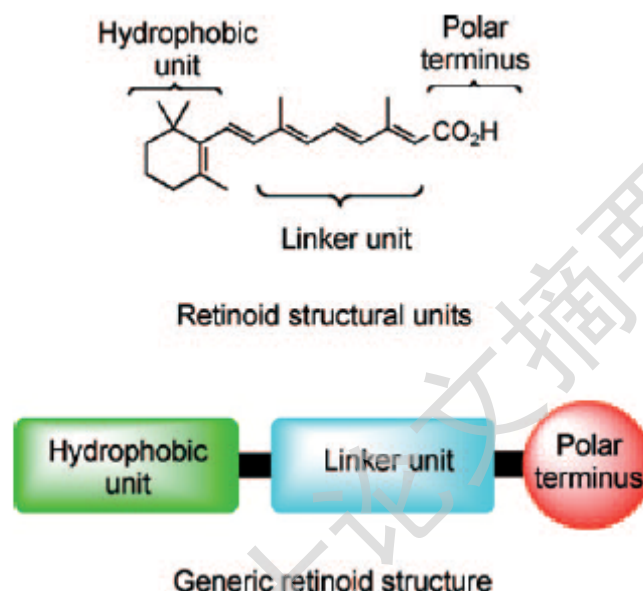


图 3. 维甲酸的基本结构（引自参考文献 39）

Fig.3. Retinoid structure

视黄醇类活性物质 (retinoids) 是一类天然的或人工合成的维生素A的衍生物, 调节生长、分化和凋亡等多种生物学效应, 主要是通过RXRs和RARs两类受体来介导<sup>[34-38]</sup>。天然的全反式维甲酸ATRA、13- *cis*-RA维甲酸、9-*cis*-RA以及化学合成的TTNPB已被开发成治疗皮肤癌的药物, 广泛应用于临床。通过对维甲酸类化合物构效关系的研究发现, 若要呈现生物活性, 其结构必须满足以下三个条件, 或具有等效的构象: 分子一端具有疏水性和立体性的基团; 另一端具有带有极性的基团, 通常情况下是一羧基; 中间为连接疏水端和极性端的共轭链, 见图3<sup>[39,40]</sup>。

天然的维甲酸ATRA和9-*cis*-RA均可激活RARs, 但只有9-*cis*-RA才可激活RXRs。通过晶体学研究发现, 无论结合配体与否, RARs与RXRs的LBP均有很大的不同, RARs的LBP为“*I*”型, 而RXRs的LBP为“*L*”型<sup>[41,42]</sup>。因此, 线性



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库